

## ОТЗЫВ официального оппонента

на диссертацию Сульдиной Любови Александровны

«Особенности ультраструктурной организации клеток человека с увеличенным числом CAG повторов в гене *HTT*, полученных от пациентов с болезнью

Хантингтона или в результате генетической модификации», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.22. –клеточная биология (биологические науки).

**Актуальность исследования.** Болезнь Хантингтона (БХ) (хорея Хантингтона/синдромом Гентингтона) - это генетическое нейродегенеративное заболевание, обусловленное гибелью нейронов стриатума, которое вызывается увеличением числа CAG повторов в гене белка хантингтина (*HTT*). Удлинение полиглутаминовых трактов, вызванное повышенным числом CAG повторов, приводит к агрегации молекул мутантного белка хантингтина между собой и другими белками, в результате чего формируются внутриклеточные агрегаты. Роль этих агрегатов в развитии болезни не до конца установлена. Наиболее перспективным объектом для изучения БХ являются клеточные культуры, несущие увеличенное число CAG повторов в гене *HTT*. Один из подходов создания таких моделей является получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) из соматических клеток больных пациентов и их дальнейшая дифференцировка в средние шипиковые нейроны стриатума. Такие пациент-специфичные клетки позволяют анализировать схожие мутации в различном генетическом фоне и могут применяться для разработки стратегии лечения конкретного пациента в контексте персонализированной медицины. Ещё одним способом разработки клеточных моделей является внесение мутации в геном культивируемых линий клеток человека с помощью систем геномного редактирования. Полученные в результате трансгенные модельные линии клеток человека позволяют получить генетически идентичные (изогенные) клоны, отличающиеся только изменением в целевом гене.

В своей работе Сульдина Любовь Александровна с помощью высокоразрешающей электронной микроскопии исследовала последствия увеличения числа CAG повторов в гене *HTT* на структурно-функциональную организацию цитоплазматических органелл в культурах клеток средних шипиковых нейронов, дифференцированных из ИПСК пациентов с БХ (42 и 47 CAG повторов),

а также генетически модифицированных нейронов, несущих 69 CAG повторов, а также клеток НЕК293 несущих 100-150 CAG повторов в гене *HTT*. Высокоразрешающая электронная микроскопия позволяет не только охарактеризовать патологический фенотип, то есть оценить соответствие клеточной модели исследуемому заболеванию, а также выявить ранее не наблюдавшиеся нарушения структуры органелл при мутации гена и, в комбинации с морфометрическим анализом параметров клетки и ее органелл, оценить влияние лекарственных кандидатов.

**Научная новизна и значимость работы** состоит, в проведении сравнительного анализа и характеристики патологических изменений органелл в линиях клеток с различным увеличенным числом CAG повторов в гене *HTT*. Показано, что мутантные нейроны характеризуются схожими нарушениями морфологии 3-х типов органелл: шероховатого и гладкого ЭПР (везикуляция мембран); митохондрий (дефекты оболочек, крист и матрикса) и аутолизосом (нарушение целостности мембраны). В работе впервые была установлена связь между увеличением числа CAG повторов в гене *HTT* и появлением нарушений в организации синапсов дендритов и шипиков, в мутантных трансгенных нейронах, а также ростом числа гибнущих клеток. В цитоплазме мутантных клеток НЕК293 со 150 повторами в гене *HTT* впервые были выявлены 4-х-слойные мембраны, сформировавшиеся в результате взаимного слияния двух цистерн ЭПР. Кроме того, Любовь Александровной впервые было показано, что ингибитор депо-зависимых кальциевых каналов EVP4592 снижает количество дефектных митохондрий и аутолизосом в цитоплазме пациент-специфичных мутантных нейронов.

**Структура диссертации** является классической и содержит все необходимые разделы: введение, обзор научной литературы, описание использованных материалов и методов исследования, результаты, обсуждение, заключение, выводы и список цитированной литературы. Текст диссертации изложен на 157 страницах, содержит 2 таблицы, 36 рисунков, список использованной литературы включает 278 источников.

Материалы диссертации были представлены на 8 международных и российских конференциях в 2016-2022 гг., по ним было опубликовано 4 англоязычных статьи в

рецензируемых изданиях рекомендованного перечня ВАК, включая 1 статью в высокорейтинговом журнале «Molecular Neurodegeneration», 2 - в русскоязычных.

Глава «Обзор литературы» отражает все аспекты, необходимые для понимания темы диссертации. В разделе кратко охарактеризованы особенности патогенеза БХ, структурно-функциональной организации нейронов как в норме, так и при БХ, кроме этого в разделе описаны методы и подходы, используемые для изучения механизмов развития нейродегенеративных заболеваний.

В главе «Материалы и методы» представлены все методы, которые были использованы автором в ходе выполнения диссертационной работы. В работе использован довольно ограниченный набор методов, а именно, характеристика линий, фиксация и заключение образцов для электронной микроскопии, получение и окрашивание полутонких и ультратонких срезов и морфометрический анализ. Однако поскольку работа посвящена ультраструктурному исследованию, то используемый небольшой набор методов вполне адекватен и уместен.

В главе «Результаты» изложены все полученные автором данные, которые подразделяются на 3 разные части: исследование ультраструктуры пациент-специфичных нейронов с увеличенным числом CAG повторов в гене *HTT*; исследование ультраструктурной организации генетически модифицированных нейронов с увеличенным до 69 числом CAG повторов в гене *HTT*; исследование ультраструктурной организации клеток НЕК293 с увеличенным числом (100-150) CAG повторов в гене *HTT*. В работе приведено огромное количество иллюстраций, проведен морфометрический анализ микрофотографий. Все полученные данные статистически обработаны для корректного сравнения результатов.

В главе «Обсуждение» Любовь Александровна обсуждает сходство морфологических дефектов, стресс ЭПР, особенности структурной организации митохондрий, рост числа и дефектов аутолизосом в нейронах с увеличенным числом CAG повторов в гене *HTT*. А также затрагивает проблему уменьшения числа шипиков на дендритах нейронов с увеличенным числом CAG повторов в гене *HTT*, улучшение морфологии нейронов при инкубации с ингибитором кальциевых каналов. В результате использования трех различных клеточных линий, отличающихся числом CAG повторов в гене *HTT*, были выявлены не только сходные морфологические клеточные нарушения, но и была показана взаимосвязь между

числом повторов и патологическими проявлениями. Автором также обсуждается наблюдение, что при деградации нервной ткани при БХ, дегенеративные изменения затрагивают функциональную организацию части нейрона, непосредственно участвующую в передаче нервного сигнала.

В данной главе автор обсуждает также один из новых полученных им результатов по формированию 4-х слойных мембран в клетках человека с числом CAG повторов более 100.

В разделе «Заключение» суммируются полученные данные и дается обобщение, содержащее концентрированное изложение сути работы. Выводы данной диссертационной работы обоснованы, следуют из результатов и соответствуют поставленным задачам.

Автореферат диссертации оформлен в соответствии с требованиями, дает полное представление об основных положениях работы.

**Замечания.** Работа Сульдиной Любови Александровны хорошо оформлена и легко читается. В качестве небольшого замечания хочется пожелать автору описывать все используемые методики в разделе «Материалы и методы», в этом разделе отсутствует методика инкубации клеток с ингибитором кальциевых каналов EVR4593. Все возникшие замечания (опечатки, знаки препинания, курсивы) носят редакционный характер и никак не отражаются на высокой положительной оценке выполненной работы.

**Заключение.** Диссертационная работа Сульдиной Любови Александровны «Особенности ультраструктурной организации клеток человека с увеличенным числом CAG повторов в гене *HTT*, полученных от пациентов с болезнью Хантингтона или в результате генетической модификации» полностью соответствует специальности клеточная биология. Данная работа выполнена на высоком уровне и производит хорошее впечатление по масштабу выполненных работ. Представленная работа по актуальности, методическому уровню, значимости полученных результатов, выводов и полноте их опубликования отвечает требованиям п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней» (утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г.), предъявляемым

к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Сульдина Любовь Александровна заслуживает присуждения степени кандидата наук по специальности 1.5.22 - клеточная биология.

Официальный оппонент:

С.н.с. лаборатории клеточного деления

ИМКБ СО РАН, кандидат биологических наук (03.00.15 – генетика)

*Аюшечко*

Огиенко Анна Александровна

15.10.2023



Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук
Подпись <i>Огиенко А. А.</i>
Зав. канцелярией <i>Огиенко А. А.</i>
«16» 10 2023 г.

Адрес места работы:

Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН (ИМКБ СО РАН)

Адрес: 630090, Новосибирск, Россия, пр.ак.Лаврентьева, 8/2

Телефон: +7(383) 363-90-42

Факс: +7(383) (383) 363-90-78

E-mail: [ogienko.anna@mcb.nsc.ru](mailto:ogienko.anna@mcb.nsc.ru)